

Chronic probucol treatment decreases the slow component of the delayed-rectifier potassium current in CHO cells transfected with KCNQ1 and KCNE1 : a novel mechanism of QT prolongation

著者	谷口 智彦
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 6232, 2012.3.23 Includes bibliographical references (leaves 17-20)
発行年	2012
その他のタイトル	KCNQ1及びKCNE1発現CHO細胞におけるプロブコールの長時間暴露による緩徐活性型遅延整流性カリウム電流の減少 : QT延長に関する新規メカニズム
URL	http://hdl.handle.net/2241/118048

[357]

氏 名 (本籍)	谷 口 智 彦 (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 6232 号		
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Chronic probucol treatment decreases the slow component of the delayed-rectifier potassium current in CHO cells transfected with KCNQ1 and KCNE1: a novel mechanism of QT prolongation (KCNQ1 及び KCNE1 発現 CHO 細胞におけるプロブコールの長時間曝露による緩徐活性型遅延整流性カリウム電流の減少：QT 延長に関する新規メカニズム)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	青 沼 和 隆
副 査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	本 間 真 人
副 査	筑波大学教授	医学博士	久 賀 圭 祐
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	西 丸 広 史

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

薬剤による QT 延長の副作用は临床上重要な課題であり、現在でも市場撤退を余儀なくされる原因となっている。薬剤の開発においては探索早期段階に I_{Kr} に対する阻害活性を hERG チャネル発現細胞を用いて調べることによって、 I_{Kr} 抑制に基づく潜在的 QT 延長のリスク評価を行っている。一方で I_{Ks} は I_{Kr} とともに、心臓の活動電位の再分極に重要な役割を担っており、先天的な I_{Ks} チャネルタンパクの異常が QT 延長症候群を惹起することが知られている。従って、化合物の I_{Ks} に対する影響を調べることはヒトでの QT 延長のリスク評価に重要と考えられるが、 I_{Ks} の阻害活性を調べるのが薬剤開発上の必須事項となっていないため、薬物による I_{Ks} 抑制に関しては十分に検討が進んでいない。最近になって、化合物が直接的な hERG 電流阻害作用を示さず、長時間曝露によってのみ hERG 電流が減少して、QT 延長が見られる臨床例が報告されてきている。しかしながら I_{Ks} に関して同様に長時間曝露による作用を調べた報告はない。本研究では I_{Ks} に対する化合物の長時間曝露による影響を種々の化合物を用いて調べ、probucol が I_{Ks} に対して非常に低い濃度で抑制作用を示すことを見出し、そのメカニズムを詳細に検討した。

(対象と方法)

I_{Ks} をコードする KCNQ1 及び KCNE1 遺伝子を、ウイルスベクターを用いて CHO 細胞に導入した。 I_{Ks} 電流は IonWorks Quattro の Population Patch Clamp mode を用いて測定し、 I_{Ks} 阻害剤 (HMR1556, chromanol 293B, terfenadine) を用いて薬理的に確認した。この細胞を代表的な I_{Ks} 阻害剤 (HMR1556, chromanol 293B, L-768673) や hERG trafficking 阻害剤 (amiodarone, 17-AAG, thioridazine, pentamidine, probucol) で 24 時間処置した後、薬物非存在下にて電流を測定し、媒体処理との比較を行った。また、hERG チャネル発現 CHO 細胞においても、probucol による 24 時間曝露の作用を検討した。更に、probucol の 24 時間曝露による KCNQ1

タンパクの変化を Western blotting にて検出した。

(結果)

KCNQ1/KCNE1 チャネル電流は I_{Ks} の特性を持っていることが、 I_{Ks} 波形及び I_{Ks} 阻害剤への反応から確認できた。ほとんどの I_{Kr} 、 I_{Ks} 阻害剤は 24 時間曝露後に wash out すると I_{Ks} 電流に影響を与えなかったが、3 μ M の probucol では非常に強い抑制作用が確認された。そこで probucol に着目して詳細な検討を行った。probucol の 24 時間曝露による I_{Ks} の 50% 阻害濃度は 149.1 nM であった。また、probucol 処置により活性化及び不活性化の時定数の減少が見られた。一方、 I_{Ks} チャネルに対する直接的な影響は 10 μ M まで見られなかった。probucol を 2、4、8 及び 24 時間処理し I_{Ks} 抑制の時間変化を調べたところ、0.3 及び 1 μ M では 2 時間後から有意に抑制が見られた。また、24 時間処理後、probucol を洗浄し回復の時間経過を調べたところ、時間依存的に電流の回復が見られ、回復時間 24 時間で 0.03 及び 0.1 μ M は媒体と同じレベルまで回復した。さらに、hERG 電流へは 1-30 μ M でわずかな抑制を示したが、濃度依存性は示さなかった。Probucol の 24 時間処置後、KCNQ1 タンパクの単量体に変化はなかったが、KCNQ1 タンパクの複合体は減少していた。

(考察)

probucol は I_{Kr} および I_{Ks} いずれに対しても直接的な抑制作用を有していないが、長時間曝露により I_{Ks} 電流を特異的に減少させる作用を持つと考えられる。通常 I_{Ks} チャネルは、4 つの α サブユニット (KCNQ1)、2 つの β サブユニット (KCNE1) およびアダプタータンパクからなる複合体を形成している。KCNQ1 チャネルは KCNE1 との会合により、チャネル電流の活性化及び不活性化が遅延する。本研究において probucol の長時間処置により活性化及び不活性化が速やかになったこと及び、KCNQ1 タンパクの複合体が減少したことから、 I_{Ks} チャネル複合体の構造が崩れたことによる機能異常がヒトでの QT 延長作用に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

薬剤による QT 延長の副作用は重要な問題であるが、 I_{Ks} に対する薬剤の長時間曝露による影響を調べた報告はない。本研究では probucol の長時間曝露が I_{Ks} に対して非常に低い濃度で抑制作用を示すことを見出し、その詳細なメカニズムを検討した。その結果、probucol は非常に強い I_{Ks} 電流抑制作用を有し、この効果は 0.3 及 μ M で 2 時間後から有意に見られる事が判明し、この作用は I_{Ks} に対する直接的な抑制作用ではなく、長時間曝露によって I_{Ks} 電流が特異的に減少するためである事が観察された。更にその原因として I_{Ks} チャネル複合体構造の崩壊による機能異常が関与している可能性を明確にした。

平成 23 年 12 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。